

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 14, 1976, pp. 109–117

Der vorgetäuschte Enzymaustritt

Verteilung und Transport von Zellenzymen im extrazellulären Raum, I. Mitteilung

Von R. Friedel¹), H. Mattenheimer, I. Trautschold und G. Forster

Institut für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover und Departments of Biochemistry and Medicine, Rush-Presbyterian-St. Lukes Medical Center, Chicago, Illinois, USA.

(Eingegangen am 9. April/17. Dezember 1975)

Zusammenfassung: Nicht jede Aktivitäts-Zunahme von Zellenzymen im Blutplasma beruht auf einem Enzymaustritt aus geschädigten Zellen. Mit Hilfe dreier Versuchsmodelle wird gezeigt, daß akute Aktivitätsänderungen in der Größenordnung von bis zu $\pm 15\%$ auf Flüssigkeits-Verschiebungen zwischen Intra- und Extravasalraum zurückgeführt werden können. Bei der venösen Stauung einer Extremität kommt es wegen der Erhöhung des intravasalen hydrostatischen Druckes distal des Staus zu einer Einengung des Intravasalraumes und, daraus resultierend, zu einer Konzentrations-Erhöhung makromolekularer Bestandteile des Blutplasmas. Änderungen der Körperlage bewirken Änderungen des Plasmavolumens und korrespondierende Änderungen von intravasalen Enzymaktivitäten ebenso wie der Proteinkonzentration des Blutplasmas. Die während schwerer körperlicher Arbeit (30 min, 150 W) zu beobachtende Zunahme von intravasalen Enzymaktivitäten beruht überwiegend auf einfachen Konzentrations-Effekten und nicht auf Austritt von Enzymaktivitäten aus übermäßig belasteten oder hypoxisch geschädigten Muskelzellen. Erst in der Erholungsphase nach Beendigung der Belastung ist ein Enzymaustritt nachweisbar. Zusätzlich zur Änderung des Plasmavolumens dürfte sich während und nach körperlicher Arbeit ganz entscheidend die Zunahme des Lymphflusses auf die intravasalen Enzymaktivitäten auswirken.

The feigned release of cell enzymes, Distribution and transport of cell enzymes within the extracellular space, I

Summary: A sudden increase of enzyme activities in plasma is not necessarily due to a release of enzymes from damaged cells. Three experimental models were used to demonstrate that acute alterations of enzyme activities, as much as $\pm 15\%$, can be caused by fluid-shifts between the intra- and extravascular compartments. Venous occlusion of the forearm by tourniquet produces an increase of the intravascular hydrostatic pressure and subsequently results in a decrease of the plasma volume distal to the tourniquet. Because enzyme molecules are not freely diffusible across the capillary membrane the enzymatic activity increases proportionally to the decrease of plasma volume. Changes in the body posture are accompanied by changes in plasma volume and similarly by alterations in the concentration of plasma-proteins and by alterations in intravascular enzyme activities. Increased enzyme activities in plasma during strenuous physical effort are due chiefly to a concentration of macromolecules within the intravascular space because of a decrease in plasma volume and not to a release of enzymes from hypoxic muscle cells. During recovery after termination of the exercise there is a second and longer lasting increase in enzyme activities in plasma which could be related to a release of enzymes from injured cells. It is suggested that some of these changes could be due to an increase in lymph flow and thereby an increasing transport of enzymes from the interstitial to the intravascular compartment.

Einleitung und Fragestellung

Die Höhe von Enzymaktivitäten im Blutplasma ist abhängig von den folgenden Prozessen:

- a) der Übertrittsrates von Enzymaktivität vom intrazellulären in den extrazellulären Raum und hierbei evtl. auftretenden Aktivitätsänderungen,

- b) der Verdünnung, die die Aktivität der einzelnen Enzyme durch die Verteilung auf Bereiche des extrazellulären Raumes erfährt,
- c) der Geschwindigkeit, mit der Enzymaktivität in den Intravasalraum übertritt oder transportiert wird und
- d) der Geschwindigkeit, mit der Enzymaktivität endgültig aus dem Intravasalraum verschwindet.

Ziel der Enzymdiagnostik ist es, aus der Erhöhung von Enzymaktivitäten im Blutplasma eine Zellschädigung in

¹) Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

bestimmten Organen oder Organteilen zu erkennen und zudem aus der aktuellen Höhe von Enzymaktivitäten das Ausmaß der Schädigung abzuschätzen. Unsere heutigen Kenntnisse über die Elimination von Zellenzymen aus dem Blutplasma (1–4, Literaturübersicht bis 1969: l.c. (5)), besonders die Erkenntnis aber, daß die für jedes Enzym und für jede Spezies spezifischen Eliminationsraten auch unter pathologischen Bedingungen sehr konstant sind, haben uns diesem Ziel näher gebracht, da eine der o.g. möglichen Variablen als für jedes Enzym charakteristische Konstante angesehen werden kann. Gemeinhin werden sowohl in der Routinediagnostik als auch in der experimentellen Medizin auch die restlichen Variablen bis auf den Enzymaustritt selbst als Konstanten betrachtet. Folglich wird jede akute Erhöhung von Enzymaktivitäten im Blutplasma als sicheres Zeichen für einen Enzymaustritt und somit wegen der physiologischen Impermeabilität der Zellmembran für Proteine als pathologisches Ereignis gewertet. Beispielsweise werden die bei starker physischer Belastung regelmäßig beobachteten Aktivitätserhöhungen ausnahmslos auf einen Enzymaustritt aus hypoxisch geschädigten Geweben zurückgeführt (Literaturübersicht bei l.c. (6), (7), ferner: 8–10). Uneinigkeit besteht lediglich über den unmittelbar auslösenden Faktor für den postulierten Enzymaustritt.

In den hier vorgelegten Untersuchungen soll gezeigt werden, daß akute Änderungen von Enzymaktivitäten im Blutplasma, wie sie beispielsweise bei einer der Blutentnahme vorangehenden venösen Stauung, bei Änderung der Körperlage oder bei schwerer körperlicher Arbeit zu beobachten sind, in erster Linie auf einer intravasalen Konzentrierung oder Verdünnung hochmolekularer Plasmabestandteile beruhen und allein durch physiologische Änderungen der Hämodynamik ein Enzymaustritt vorgetäuscht werden kann. Es soll weiter gezeigt werden, welchen Einfluß derartige physiologische Aktivitätsänderungen auf Normal- oder Referenzwerte bzw. die sogenannten Normbereiche haben können.

Methodik

Als Versuchspersonen dienten klinisch gesunde Medizinstudenten und Laborpersonal beiderlei Geschlechts im Alter von 20–45 Jahren. Die Blutproben wurden mit Einmalspritzen entnommen, in Polypropylen-Gefäße übergeführt und sofort zentrifugiert (2 min, $12.000 \times g$). Das überstehende Nativplasma wurde abgetrennt, nach erfolgter Nachgerinnung, die in der Regel innerhalb ein bis zwei Stunden abgeschlossen war, gelangten die vom Fibringerinnsel befreiten Serumproben zur Analyse. Akute Änderungen von Enzymaktivitäten wurden durch venöse Stauung einer Extremität, durch Änderung der Körperlage und durch schwere körperliche Arbeit provoziert.

Venöse Stauung

Nach Entnahme einer Blutprobe aus der ungestauten V. antecubitalis wurde der Blutabfluß aus dem Unterarm durch Anlegen einer Blutdruckmanschette mit einem Druck von 60–80 mmHg unterbrochen. 5 und 15 Minuten nach Anlegen der Stauung wurden Blutproben aus der gestauten V. antecubitalis entnommen.

Änderung der Körperlage

Zu Versuchsbeginn – die Probanden waren bis dahin ihrer normalen Tätigkeit nachgegangen – wurde Blut aus einer ungestauten Vene entnommen. Nach jeweils 20minütigen Perioden von flachem Liegen, aufrechtem Stehen und erneutem flachen Liegen wurden weitere Blutproben entnommen.

Körperliche Arbeit

Die untrainierten Versuchspersonen hatten auf einem Fahrrad-Ergometer für 30 min eine Leistung von 150 Watt zu erbringen. Bei zwei Probanden mußte der Versuch wegen völliger Erschöpfung nach 20 bzw. 25 min abgebrochen werden. Vor der Belastung, 15 min nach Beginn, unmittelbar nach ihrer Beendigung, sowie nach weiteren 30 min und 240 min wurden Blutproben aus einer ungestauten Vene entnommen.

Meßmethoden

Aus den Blutproben wurde der venöse Hämatokrit durch Zentrifugation von Kapillaren für 15 min bei $20.000 \times g$ bestimmt. Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration des Blutes erfolgte nach einer Standardmethode im Mikrolitermaßstab (11). Der Proteingehalt der Serumproben wurde mit Hilfe der Biuret-Reaktion bestimmt.

Im Serum wurden die Aktivitäten folgender Enzyme bestimmt:

Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27)
 Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37)
 Aspartataminotransferase (EC 2.6.1.1)
 Alaninaminotransferase (EC 2.6.1.2)
 γ -Glutamyltransferase (EC 2.3.2.2)
 Creatinkinase (EC 2.7.3.2)

Die Bestimmungen erfolgten im optischen Test bei 365 nm, die Aktivität der γ -Glutamyltransferase wurde kolorimetrisch bei 405 nm bestimmt. Es wurde mit Mikrolitermethoden (11) gearbeitet; die Messungen erfolgten bei 25°C in teilmechanisierten Meßplätzen, die Aktivitäten wurden als U/l berechnet.

Testansätze (Endkonzentrationen):

Lactatdehydrogenase

Triäthanolamin-Puffer, pH 7,5, 50 mmol/l; NADH 0,35 mmol/l; Pyruvat 0,55 mmol/l.

Malatdehydrogenase

Triäthanolamin-Puffer, pH 7,5, 50 mmol/l; NADH 0,35 mmol/l; Oxalacetat 2,0 mmol/l.

Aspartataminotransferase

Phosphatpuffer, pH 7,5, 100 mmol/l; NADH 0,50 mmol/l; 2-Oxoglutarat 10,5 mmol/l; Malatdehydrogenase 10 kU/l; L-Aspartat 50 mmol/l.

Alaninaminotransferase

Phosphat-Puffer, pH 7,5, 100 mmol/l; NADH 0,50 mmol/l; 2-Oxoglutarat 10,5 mmol/l; Lactatdehydrogenase 5 kU/l; L-Alanin 80 mmol/l.

γ -Glutamyltransferase

Tris-Puffer, pH 8,5, 100 mmol/l; γ -Glutamyl-*p*-nitroanilid 3,5 mmol/l; Glycyl-Glycin 50 mmol/l.

Creatinkinase

Triäthanolamin-Puffer, pH 7,0, 90 mmol/l; Glucose 20 mmol/l; Mg^{++} 10 mmol/l; ADP 1 mmol/l; AMP 10 mmol/l; NADH 0,7 mmol/l; Creatinphosphat 35 mmol/l; Hexokinase 1 kU/l; Glucose-6-phosphatdehydrogenase 1 kU/l; Dithioerythrit 1,2 mmol/l.

Ergebnisse

Venöse Stauung

Der Einfluß einer venösen Stauung auf Enzymaktivitäten und die Proteinkonzentration im Blutserum sowie auf den Hämatokrit sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Alle Parameter nahmen im Verlaufe der Stauung signifikant zu. Der relative Zuwachs an Enzymaktivität betrug

Tab. 1. Einfluß einer venösen Stauung auf Enzymaktivitäten (U/l) und Protein (g/l) im Blutserum und auf den Hämatokrit des Blutes der gestauten Extremität.

Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichung (s_x). Signifikanzwahrscheinlichkeiten der relativen Änderungen: + 2P < 0,05; ++ 2P < 0,01; n = 8.

Blutentnahme		Lactatdehydrogenase	Malatdehydrogenase	Aspartataminotransferase	Alaninaminotransferase	γ -Glutamyltransferase	Protein	Hämatokrit
Vor der Stauung	\bar{x}	112,0	70,2	10,0	10,6	10,8	68,4	0,453
	s_x	17,7	14,8	2,8	5,0	9,3	7,4	0,037
5 min nach Beginn der Stauung	\bar{x}	126,7	83,1	11,0	12,2	13,1	78,3	0,488
	s_x	24,5	21,5	3,3	5,9	13,2	9,5	0,044
Relative Änderung	\bar{x}	+ 12,8	+ 17,5	+ 10,1	+ 15,4	+ 13,7	+ 14,6	+ 7,8
	s_x	6,7	8,9	8,1	10,1	14,4	7,3	4,7
	2P	++	++	++	++	+	++	++
15 min nach Beginn der Stauung	\bar{x}	127,8	83,5	11,2	11,9	12,8	79,2	0,491
	s_x	21,6	18,4	2,0	5,5	11,5	6,2	0,041
Relative Änderung	\bar{x}	+ 14,3	+ 19,2	+ 15,1	+ 14,2	+ 18,5	+ 16,5	+ 8,3
	s_x	9,0	12,7	11,7	8,2	13,0	10,4	5,1
	2P	++	++	++	++	++	++	++

nach 5 min im Mittel zwischen 10,1% (Aspartataminotransferase) und 17,5% (Malatdehydrogenase). Die Proteinkonzentration hatte um 14,6%, der Hämatokrit um 7,8% zugenommen. Im Verlaufe der folgenden 10 min wurde für alle Parameter, mit Ausnahme der Alaninaminotransferase, ein nur noch leichter weiterer Anstieg beobachtet. Die Ergebnisse von einer Versuchsperson, bei der zufällig eine anikterische Hepatitis entdeckt wurde, sind nicht mit in die Tabelle aufgenommen worden. Hier waren die durch Stauung bedingten Effekte besonders eindrucksvoll. Innerhalb 5 min stieg die Aspartataminotransferase-Aktivität von 30,6 auf 36,2 U/l, die Alaninaminotransferase-Aktivität von 80,1 auf 95,6 U/l an. Die Proteinkonzentration nahm um 20,4% zu (73,6 gegenüber 88,6 g/l), der Hämatokrit erhöhte sich von 0,393 auf 0,436.

Änderung der Körperlage

Wie aus der Tabelle 2 hervorgeht, wurden für alle Parameter die niedrigsten Werte dann gefunden, wenn die Probanden vor der Blutentnahme 20 min flach gelegen hatten. Sowohl vor dieser Versuchsperiode (Blutentnahme aus normaler Tätigkeit heraus) als auch nach aufrechtem Stehen für 20 min wurden signifikant höhere Werte gefunden. In der abschließenden Versuchsperiode, in der die Probanden wiederum 20 min flach liegen mußten, fielen sämtliche Werte erneut stark ab, erreichten jedoch im Mittel nicht diejenigen aus der 2. Versuchsperiode, die ja ebenfalls nach einer Liegezeit von 20 min gewonnen waren. Die durchschnittlichen relativen Än-

derungen lagen zwischen 10% und 17%; lediglich die Aktivitätsänderungen der Malatdehydrogenase und Alaninaminotransferase fielen mit 22% bzw. 29% aus diesem Rahmen.

Für den Hämatokrit wurden nach der dritten Periode (Stehen) im Mittel um 8,3% höhere Werte gefunden als nach der zweiten (Liegen).

Körperliche Arbeit

Während der schweren physischen Belastung wurde ein akuter Anstieg sämtlicher Enzymaktivitäten, der Hämoglobin- und Proteinkonzentrationen und des Hämatokrits beobachtet (Tab. 3). Unmittelbar nach Beendigung der Arbeit waren sämtliche Meßgrößen signifikant erhöht. Für die relativen Aktivitätszunahmen wurden folgende Mittelwerte gefunden: γ -Glutamyltransferase 11,9%, Alaninaminotransferase 12,6%, Creatinkinase 19,1%, Lactatdehydrogenase 19,1%. Die Proteinkonzentration hatte um 11,7%, der Hämoglobingehalt des Blutes um 10,8%, der Hämatokritwert um 9,3% zugenommen. 30 min später hatten sich die Alaninaminotransferase- und γ -Glutamyltransferase-Aktivitäten, die Protein- und Hämoglobinkonzentrationen sowie der Hämatokrit weitgehend normalisiert. Die Aktivitäten der Lactatdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Aspartataminotransferase und Creatinkinase hatten ebenfalls deutlich abgenommen, waren aber immer noch signifikant gegenüber dem Ausgangswert

Tab. 2. Einfluß der Körperlage auf Enzymaktivitäten (U/l) und Protein (g/l) im Blutserum, auf das Hämoglobin im Vollblut (g/l) und auf den Hämatokrit des Blutes.

Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichungen (s_x) und Anzahl der untersuchten Versuchspersonen (n).

Signifikanzwahrscheinlichkeiten der Unterschiede zu den Werten der Blutentnahme II:

o 2P > 0,05; + 2P < 0,05; ++ 2P < 0,01.

Blutentnahme	n	Lactatdehydrogenase	Malatdehydrogenase	Aspartataminotransferase	Alaninaminotransferase	γ -Glutamyltransferase	Creatinkinase	Protein	Hämoglobin	Hämatokrit
	8	8	7	7	7	6	8	5	8	
I. aus normaler Tätigkeit	\bar{x}	113,7	81,3	9,1	7,1	8,4	31,3	76,6	145	0,443
	s_x	19,7	12,8	1,9	3,0	4,1	6,2	4,7	26	0,046
	2P	++	++	+	++	++	+	++	+	++
II. nach 20 min Liegen	\bar{x}	101,4	68,8	8,3	5,9	7,7	30,1	71,5	136	0,417
	s_x	20,1	9,9	1,9	2,6	4,3	6,2	3,6	25	0,045
III. nach 20 min Stehen	\bar{x}	111,5	84,1	9,6	7,4	8,4	35,1	80,5	149	0,452
	s_x	18,9	15,9	2,0	2,6	4,7	7,4	7,4	26	0,054
	2P	++	++	++	++	+	++	++	++	++
IV. nach 20 min Liegen	\bar{x}	105,4	72,7	8,7	6,4	7,9	32,2	73,1	140	0,427
	s_x	21,4	13,8	1,9	2,8	4,1	7,1	5,7	23	0,045
	2P	++	o	+	o	o	o	o	o	++

Tab. 3. Einfluß von kurzdauernder schwerer Ergometer-Arbeit (30 min, 150 W) auf Enzymaktivitäten (U/l) und Protein (g/l) im Blutserum, auf das Hämoglobin im Vollblut (g/l) und auf den Hämatokrit des Blutes.

Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (s_x). Signifikanzwahrscheinlichkeiten der Unterschiede vom Ausgangswert:

o 2P > 0,05; + 2P < 0,05; ++ 2P < 0,01. n = 8.

Blutentnahme		Lactatdehydrogenase	Malatdehydrogenase	Aspartataminotransferase	Alaninaminotransferase	γ -Glutamyltransferase	Creatinkinase	Protein	Hämoglobin	Hämatokrit
vor der Arbeit, nach 15 min Sitzen	\bar{x}	125,9	76,5	8,9	9,3	8,2	42,8	75,9	163	0,477
	s_x	11,9	10,7	1,3	2,6	2,6	7,5	3,3	7	0,014
15 min nach Beginn der Arbeit	\bar{x}	145,0	90,9	9,9	9,8	8,9	48,3	83,7	180	0,508
	s_x	18,2	15,6	1,4	3,1	3,5	7,3	3,8	8	0,022
	2P	++	++	++	o	o	++	++	++	++
sofort nach Schluß der Arbeit	\bar{x}	150,0	104,3	10,8	10,4	8,9	50,1	84,7	180	0,518
	s_x	16,5	16,5	1,4	2,8	3,2	9,3	3,7	11	0,019
	2P	++	++	++	++	+	++	++	++	++
30 min nach Schluß der Arbeit	\bar{x}	139,9	92,8	9,9	9,5	8,1	47,7	77,3	168	0,482
	s_x	22,2	14,8	1,4	3,0	2,7	7,2	4,7	7	0,02
	2P	+	+	++	o	o	+	o	o	o
240 min nach Schluß der Arbeit	\bar{x}	142,7	100,6	10,2	9,5	8,1	88,7	74,4	159	0,468
	s_x	15,4	11,0	0,9	2,3	2,8	47,4	2,4	6	0,014
	2P	++	++	++	o	o	+	o	o	o

erhöht. Diese vier Enzyme zeigten 240 min nach Beendigung der Arbeit eine erneute Aktivitätszunahme, die bei der Creatinkinase das Ausmaß der akuten Erhöhung am Ende der Belastung weit überstieg. Die restlichen Parameter hatten sich zu dieser Zeit völlig normalisiert und zeigten leicht niedrigere Mittelwerte als zu Beginn des Versuches.

Die Werte einer weiteren Blutentnahme nach 24 Stunden wurden nicht in die Tabelle 3 aufgenommen, da zu diesem Zeitpunkt nur sechs der acht Probanden zur Verfügung standen. Es wurden folgende Mittelwerte gefunden:

Lactatdehydrogenase 136 U/l, Malatdehydrogenase 82,4 U/l, Aspartataminotransferase 10,6 U/l, Alaninaminotransferase 9,5 U/l, γ -Glutamyltransferase 6,7 U/l, Creatinkinase 88,0 U/l, Protein 74,5 g/l, Hämoglobin 159 g/l, Hämatokrit 0,475.

Bei unveränderten Werten für Alaninaminotransferase, γ -Glutamyltransferase, Protein, Hämatokrit und Hämoglobin zeigten sich also für die Lactatdehydrogenase und die Malatdehydrogenase deutliche Aktivitäts-Abnahmen, während sowohl die Creatinkinase als auch die Aspartataminotransferase noch immer stark erhöht waren.

In den beiden Fällen, in denen der Versuch wegen völliger Erschöpfung der Probanden vorzeitig abgebrochen werden mußte, wurden in den während und am Ende der Arbeit gewonnenen Proben keine gegenüber dem Gesamtkollektiv auffälligen Veränderungen verzeichnet. Extreme Erhöhungen der Creatinkinase-Aktivitäten fanden sich jedoch 30 min nach Beendigung der Arbeit mit 196 U/l bzw. 99,7 U/l sowie nach 240 min mit 138 U/l bzw. 107 U/l.

Diskussion

Die drei verwendeten Versuchsmodelle scheinen geeignet, den Einfluß von extrazellulären Verteilungs- und Transportvorgängen auf intravasale Enzymaktivitäten unter physiologischen Bedingungen zu demonstrieren. Die Dauer der venösen Stauung ist sicher, soweit es den 15-min-Wert betrifft, als extrem zu bezeichnen, es sollte jedoch gerade mit diesem Versuchsmodell einerseits ein Grenzfall aus der Praxis (längere Stauung bei schlecht zu punktierenden Venen), andererseits ein Extremzustand (Hypoxie der gestauten Extremität) imitiert werden. Das Modell des Wechsels in der Körperlage entspricht streng physiologischen Bedingungen und hat besonders für stationär behandelte Patienten praktische Bedeutung. Der Belastungsversuch schließlich vermag im ersten Teil (Belastung für 15 min) physiologische Bedingungen zu erfüllen, im zweiten Teil hingegen (Fortdauer der Belastung für insgesamt 30 min) nähert er sich pathologischen Zuständen, zumal bewußt darauf verzichtet wurde, sportlich trainierte Probanden einzusetzen.

Für die Interpretation der Versuchsergebnisse war es notwendig, akute Änderungen des Plasmavolumens zumindest überschlagsmäßig zu berechnen. Dazu bedienten wir uns der Hämatokrit-

werte, obwohl derartigen Berechnungen wegen der Fehlerbreite der Hämatokritbestimmung Grenzen gesetzt sind. Das Plasmavolumen errechnet sich wie folgt:

$$PV = E \cdot \frac{1 - Hct}{Hct} \quad (1)$$

PV = Plasmavolumen, E = Erythrocyten-Gesamtvolumen, Hct = Hämatokrit.

Änderungen des Plasmavolumens (ΔPV) errechnen sich nach

$$\Delta PV = E_2 \cdot \frac{1 - Hct_2}{Hct_2} - E_1 \cdot \frac{1 - Hct_1}{Hct_1} \quad (2)$$

oder, unter der Voraussetzung, daß sich das Erythrocytenvolumen während des Versuches nicht ändert ($E_2 = E_1$):

$$\Delta PV = E \cdot \left[\frac{1}{Hct_2} - \frac{1}{Hct_1} \right] \quad (3)$$

Bei unbekanntem, innerhalb des Versuchszeitraumes unverändertem Erythrocyten-Gesamtvolumen kann aus den Hämatokritwerten die relative Änderung des Plasmavolumens berechnet werden:

$$\Delta PV_{rel.} = \left[\frac{(1 - Hct_2) \cdot Hct_1}{(1 - Hct_1) \cdot Hct_2} - 1 \right] \cdot 100 \quad (4)$$

Bei diesen Berechnungen müssen die gemessenen Hämatokritwerte korrigiert werden für den Unterschied zwischen venösem und Körper-Hämatokrit und für den „trapping factor“.

Venöse Stauung

Da während des Versuchszeitraumes kein Austausch zwischen arteriellem und venösem Blut stattgefunden haben dürfte, wurden zur Berechnung der relativen Änderungen des Intravasalraumes nach Gleichung (4) die Hämatokritwerte lediglich für den „trapping factor“, also für das trotz Zentrifugation in der Korpuskelsäule verbliebene Plasma korrigiert; dieser Faktor wurde mit 0,97 angenommen. Während der Stauung hat der Plasmaraum der Extremität nach 5 min um im Mittel $12,6 \pm 7,0\%$, nach 15 min um $13,4 \pm 7,3\%$ abgenommen (arithmetische Mittel \pm Standardabweichung, $2P < 0,005$).

Aus der für jeden einzelnen Probanden ermittelten Änderung des Plasmaraumes wurde errechnet, welche Änderungen von Enzymaktivitäten bzw. Proteinkonzentration daraus resultieren müßten, d. h. die in Tabelle 1 aufgeführten Meßwerte wurden für reine Konzentrationseffekte korrigiert. In der Tabelle 4 sind die Mittel der korrigierten Einzelwerte und die Mittel der nach der Korrektur verbliebenen relativen Abweichungen vom Ausgangswert zusammengestellt.

Aus den Daten geht eindeutig hervor, daß die während einer venösen Stauung meßbare Zunahme von Enzymaktivitäten im Intravasalraum der gestauten Extremität sicher nicht auf einen Enzymaustritt aus hypoxisch geschädigtem Gewebe, sondern einzig auf eine durch die Erhöhung des intravasalen hydrostatischen Druckes bedingte Konzentrierung von makromolekularen Bestandteilen des Plasmas zurückzuführen ist. Wenn wir als Erklärung für die intravasalen Aktivitätserhöhungen einen Enzymaustritt ablehnen und damit einer früher von Hess (12) geäußerten und später häufig zitierten Ansicht widersprechen, bedeutet das nicht, daß wir generell die Möglichkeit eines Enzymaustritts ausschlies-

Tab. 4. Einfluß einer venösen Stauung auf Enzymaktivitäten (U/l) und die Proteinkonzentration (g/l) im Blutserum aus der gestauten Extremität nach Korrektur für Änderungen des Plasmavolumens.

Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 8; ΔPV = Änderung des relativen Plasmavolumens (%).

Blutentnahme		Lactatdehydrogenase	Malatdehydrogenase	Aspartataminotransferase	Alaninaminotransferase	γ -Glutamyltransferase	Protein
vor der Stauung	\bar{x}	112,0	70,2	10,0	10,6	10,8	68,4
	s_x	17,7	14,8	2,8	5,0	9,3	7,4
5 min nach Beginn der Stauung ($\Delta PV = -12,6 \pm 7,0\%$)	\bar{x}	110,0	72,1	9,5	10,4	10,9	68,2
	s_x	18,4	16,9	2,2	4,3	10,1	7,2
mittlere Abweichung vom Ausgangswert (%)		-1,6	+2,9	-4,4	+0,7	-1,0	-0,1
15 min nach Beginn der Stauung ($\Delta PV = 13,4 \pm 7,3\%$)	\bar{x}	110,0	72,2	9,8	10,4	11,4	68,5
	s_x	15,8	16,6	2,2	4,9	11,1	7,6
mittlere Abweichung vom Ausgangswert (%)		-1,5	+3,1	-1,0	-1,6	+2,3	+0,3

sen. Wir sind vielmehr der Ansicht, daß, falls es tatsächlich zu einem Enzy Austritt gekommen sein sollte, die extrazellulär erhöhte Enzymaktivität in diesem Versuch kaum hätte erfaßt werden können, da sie sich im Interstitium hätte anstauen müssen und erst nach Lösen der Stauung via Lymphgefäße und ductus thoracicus in den Intravasalraum hätte gelangen können.

Änderung der Körperlage

Bei der Bewertung dieser Versuchsergebnisse ist zu berücksichtigen, daß im Gegensatz zum Venostase-Versuch ein Austausch zwischen arteriellem und venösem Blut stattfindet. Die Hämatokritwerte sind damit nicht nur für den „trapping factor“ sondern zusätzlich für die Differenz zwischen arteriellem und venösem Blut zu korrigieren. Hierfür wurde ein Umrechnungsfaktor von 0,91 benutzt (13); aus methodischen Gründen mußte unberücksichtigt bleiben, daß dieser Faktor wegen Blutdruck-Änderungen während des Versuches geringfügigen Schwankungen unterworfen sein muß. Zusammen mit dem „trapping factor“ von 0,97 ergibt sich somit zur Ermittlung des Körperhämatokrits aus dem venösen Hämatokrit ein Korrekturfaktor von 0,88. Aus den derart korrigierten Hämatokritwerten wurden nach Gleichung (4) die Änderungen des Plasmavolumens, bezogen auf die Werte am Ende der 2. Versuchsperiode, und daraus die allein durch Flüssigkeits-Verschiebungen bedingten Änderungen von Enzymaktivitäten und Proteinkonzentrationen berechnet; die Meßwerte wurden entsprechend korrigiert. In der Tabelle 5 sind die auf diese Weise korrigierten Mittelwerte zusammengestellt. Innerhalb der zweiten Versuchsperiode hat das Plasmavolumen um im Mittel $10,4 \pm 2,7\%$ zugenommen

($2P < 0,001$). Bei Abschluß der dritten Versuchsperiode (Stehen für 20 min) ist es hingegen um durchschnittlich $11,9 \pm 3,5\%$ niedriger als am Ende der 2. Periode ($2P < 0,001$). Die Aktivitäten der Lactatdehydrogenase, γ -Glutamyltransferase und Creatinkinase sowie die Proteinkonzentrationen zeigen nach dieser Korrektur keine wesentlichen Unterschiede zwischen den vier Versuchsperioden. Lediglich Malatdehydrogenase und Alaninaminotransferase weisen nach 20 min Liegen deutlich die niedrigsten Aktivitäten auf, wobei allerdings die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind. Abgesehen von dieser nicht eindeutigen Abweichung, die im Falle der Alaninaminotransferase noch innerhalb der analytischen Varianz liegt, zeigen die in Tabelle 5 zusammengestellten Werte, daß die durch Änderung der Körperlage provozierten Änderungen von intravasalen Enzymaktivitäten allein auf Flüssigkeits-Verschiebungen zwischen dem intra- und dem extravasalen Raum zurückzuführen sind und nicht etwa auf einen Enzy Austritt. Für andere großmolekulare Bestandteile und für korpuskuläre Elemente des Blutes sind derartige Phänomene seit langem bekannt und eingehend beschrieben (14–16).

Körperliche Arbeit

Wesentlich komplizierter gestaltet sich die Interpretation der Befunde aus den Belastungs-Versuchen. Während der eigentlichen Belastungsphase nimmt das Plasmavolumen, wie erwartet, stark ab; die Enzymaktivitäten nehmen entsprechend zu, ebenso die Proteinkonzentration. Eine wie oben durchgeführte Berechnung der Plasmavolumen-Änderung und die darauf basierende Korrektur der Meßwerte zeigt eindeutig, daß die akuten Änderungen überwiegend wiederum auf Flüssigkeits-Verschiebungen zu-

Tab. 5. Einfluß der Körperlage auf Enzymaktivitäten (U/l) und Proteinkonzentration (g/l) im venösen Blut nach Korrektur für Änderungen des Plasmavolumens gegenüber Periode II.

Mittelwerte und Standardabweichungen, N = 6–8 ΔPV = relative Änderung des Plasmavolumens bezogen jeweils auf die Vorperiode.

Blutentnahme		Lactatdehydrogenase	Malatdehydrogenase	Aspartataminotransferase	Alaninaminotransferase	γ -Glutamyltransferase	Creatinkinase	Protein
I. nach normaler Tätigkeit	\bar{x}	103,1	73,8	8,3	6,5	7,7	28,4	69,3
	s_x	19,2	13,1	1,8	2,8	3,8	6,0	3,2
II. nach 20 min Liegen ($\Delta PV = + 10,4 \pm 2,7\%$)	\bar{x}	101,4	68,8	8,3	5,9	7,7	30,1	71,5
	s_x	20,1	9,9	1,9	2,6	4,3	6,2	3,6
III. nach 20 min Stehen ($\Delta PV = - 11,9 \pm 3,5\%$)	\bar{x}	98,3	74,0	8,5	6,5	7,4	30,6	70,7
	s_x	17,6	13,6	1,9	2,4	4,3	5,2	4,5
IV. nach 20 min Liegen ($\Delta PV = + 9,9 \pm 1,3\%$)	\bar{x}	101,6	70,0	8,4	6,1	7,5	31,2	70,2
	s_x	22,3	13,8	1,8	2,6	3,9	7,0	5,0

rückzuführen sind (Tab. 6). In der Spätphase, also 30 min und 240 min nach Abschluß der Belastung, wird jedoch für die Enzyme (mit Ausnahme der γ -Glutamyltransferase) ein Aktivitätsanstieg deutlich, der nun sicher nicht auf einfachen Volumen-Änderungen beruhen kann, da sich das Plasmavolumen zu diesen Zeiten wieder normalisiert hatte.

Es läge nahe und stünde auch im Einklang mit der Literatur, zumindest diese Aktivitätsänderungen in der Spätphase auf einen Enzymaustritt aus geschädigten Zellen, vornehmlich der Muskulatur, zurückzuführen. Auch die besonders ausgeprägte Zunahme der Creatinkinase-Aktivität, eines nahezu muskelspezifischen Enzyms also, bei fehlendem Aktivitäts-Anstieg der γ -Glutamyltransferase würde diese Hypothese stützen. Bevor wir uns ihr allerdings vorbehaltlos anschließen, wollen wir kurz reflektieren, worauf die akute Abnahme des Plasmavolumens beruht, welche Auswirkungen sie für den weiteren Verlauf hat und in welchem Maße die Versuchsergebnisse durch derartige Spätfolgen beeinflusst sein könnten.

Die Abnahme des Plasmavolumens während der Arbeit beruht auf einer akuten Erhöhung des Blutdruckes und damit des Kapillardruckes besonders in der arbeitenden Muskulatur. Der intravasale hydrostatische Druck überwiegt den kolloidosmotischen Druck des Plasmas entlang der gesamten Kapillare, gleichzeitig häufen sich osmotisch aktive Metabolite im Interstitium an und führen damit zu einer weiteren Verminderung des osmotischen Gradienten über der Kapillarwand. Zwangsläufig kommt es zu einem verstärkten Ausstrom von Wasser aus dem Intravasalraum und wegen der in der peripheren Muskulatur besonders ausgeprägten relativen Impermeabilität der Kapillarwand für Proteine (17) zu einer intravasalen Konzentrierung von Proteinen. Wegen des ständigen Nachstroms von Flüssigkeit in das Interstitium steigt der Lymphstrom an und damit über den ductus

thoracicus der Zustrom Protein- und Enzym-haltiger Lymphe in den Intravasalraum. Dieser Kreislauf muß wegen des Filtrationsprozesses über die Kapillarwand zu einer Abnahme der Proteinkonzentration in der Lymphe und zu einer im Verhältnis zur Abnahme des Plasmavolumens überproportionalen Konzentrierung großmolekularer Bestandteile des Plasmas führen. Zumindest bis zu dem Zeitpunkt zu dem die austauschbare interstitielle Flüssigkeit ersetzt ist, wird das Ausmaß der intravasalen Konzentrierung durch die Plasma/Lymph-Quotienten unter homeostatischen Bedingungen bestimmt. In der Tabelle 7 ist eine rein hypothetische Berechnung zusammengefaßt, mit der am Beispiel der Plasma-Proteine und dreier fiktiver Enzyme gezeigt werden soll, wie sich die Kombination Abnahme des Plasmavolumens – Steigerung des Lymphflusses theoretisch auf die intravasale Proteinkonzentration und auf Enzymaktivitäten auswirken muß. Die für die drei fiktiven Enzyme X, Y und Z angenommenen Plasma-Lymph-Quotienten liegen in Größenordnungen, die tierexperimentell meßbar sind. Die angenommene akute Abnahme des Plasmavolumens entspricht den oben geschilderten Versuchsergebnissen; die angenommene Zunahme des Lymphflusses liegt, wenn Ergebnisse aus Tierversuchen (18, 19) zum Vergleich herangezogen werden, sicher im Rahmen der Realität oder eher zu niedrig. Unberücksichtigt bleiben mußte eine eventuelle Änderung der Kapillarpermeabilität für Proteine während des Versuches; besonders aus diesem Grunde muß die Berechnung hypothetisch bleiben. Sie kann nach dem Muster der Tabelle 7 auch erst dann exakt durchgeführt werden, wenn für den Menschen die physiologischen Plasma/Lymph-Quotienten genau bekannt sind. Immerhin kann aber schon jetzt angenommen werden, daß wahrscheinlich die Bedeutung des Enzymaustritts bisher häufig überbewertet wurde, wenn es galt, Änderungen von Enzymaktivitäten während schwerer körperlicher Arbeit zu erklären.

Auch die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß es in der Folge schwerer körperlicher Arbeit ganz sicher zu einem leichten Enzymaustritt aus geschädigten Zellen kommt – anders wäre der Anstieg der Creatinkinase in der Spätphase kaum zu erklären – gleichzeitig zeigen sie aber auch, daß eindeutig physiologische Vorgänge einen pathologischen Prozeß vortäuschen können, wenn nämlich, wie leider in der diagnostischen Praxis häufig üblich,

Tab. 6. Einfluß von kurzdauernder schwerer Ergometer-Arbeit (30 min, 150 Watt) auf Enzymaktivitäten (U/l) und die Proteinkonzentration (g/l) im Blutserum nach Korrektur für Änderungen des Plasmavolumens.

 ΔPV = relative Änderung des Plasmavolumens bezogen auf den AusgangswertSignifikanzwahrscheinlichkeiten der Unterschiede vom Ausgangswert: \circ : $2P > 0,05$; + : $2P < 0,05$; ++ : $2P < 0,01$; n = 8.

Blutentnahme		Lactatdehydrogenase	Malatdehydrogenase	Aspartataminotransferase	Alaninaminotransferase	γ -Glutamyltransferase	Creatinkinase	Protein
vor Beginn der Arbeit	\bar{x}	125,9	76,5	8,9	9,3	7,9	42,8	75,8
	s_x	11,9	10,7	1,3	2,6	2,6	7,5	3,3
15 min nach Beginn ($\Delta PV = -10,6 \pm 6,4\%$)	\bar{x}	129,9	81,6	8,9	8,8	7,9	43,0	75,5
	s_x	18,2	15,2	1,2	2,6	2,7	5,6	5,5
	2P	\circ	+	\circ	\circ	\circ	\circ	\circ
sofort nach Schluß ($\Delta PV = -13,3 \pm 4,4\%$)	\bar{x}	130,2	90,6	9,4	9,0	7,7	43,3	73,7
	s_x	17,1	16,5	1,3	2,4	2,7	7,3	5,0
	2P	\circ	+	\circ	\circ	\circ	\circ	\circ
30 min nach Schluß ($\Delta PV = -1,6 \pm 5,0\%$)	\bar{x}	137,3	91,3	9,8	9,3	7,9	46,8	75,9
	s_x	20,3	15,1	1,2	2,6	2,3	6,0	3,7
	2P	\circ	+	\circ	\circ	\circ	+	\circ
240 min nach Schluß ($\Delta PV = +2,1 \pm 3,2\%$)	\bar{x}	144,9	100,1	10,3	9,9	8,2	87,3	76,2
	s_x	15,6	10,4	1,1	2,5	3,1	51,6	2,3
	2P	++	++	+	\circ	\circ	+	\circ

Tab. 7. Bilanzierung der Ursachen für Aktivitätsänderungen von Enzymen im Blutplasma während und nach körperlicher Arbeit (teilweise hypothetisch) Plasmavolumen = 3 l

	Proteine	Enzym X	Enzym Y	Enzym Z
Plasma/Lymph Quotient	1,6	2,5	1,0	0,5
<i>Aufnahme der Arbeit</i>				
Relative Änderung von Konzentrationen bzw. Aktivitäten bei 10%iger Abnahme des Plasmavolumens	+ 11,1%	+ 11,1%	+ 11,1%	+ 11,1%
Relative Änderung bei Zunahme des Lymphflusses um 300 ml/30 min	+ 6,9%	+ 4,4%	+ 11,1%	+ 22,2%
Gesamt-Änderung	+ 18,0%	+ 15,5%	+ 22,2%	+ 33,3%
<i>Abbruch der Arbeit</i>				
Verbliebene Änderung unmittelbar nach Normalisierung des Plasmavolumens	+ 6,3%	+ 4,0%	+ 10,0%	+ 20,0%

jeder Anstieg von Enzymaktivitäten als Beweis für einen stattgefundenen Enzymaustritt gewertet wird. Auf die Bedeutung der Lymphe, ein innerhalb der Klinischen Enzymologie offensichtlich „vergessenes Organ“, werden wir in der folgenden Mitteilung näher eingehen, in der wir uns vornehmlich mit tierexperimentellen Untersuchungen befassen.

Gesamt-Wertung der Befunde

Anhand von drei Modell-Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Aktivitäten von Zellenzymen im Intra-vascularraum unter physiologischen Bedingungen in Grenzen von etwa $\pm 15\%$ schwanken können. Es wäre verfehlt und stünde im Widerspruch zur Absicht der vorge-

legten Studie, hieraus den Schluß zu ziehen, bei der Enzym-Diagnostik müsse diese intraindividuelle Varianz in Kauf genommen werden und jeder Laborbefund sei zusätzlich zur analytischen Varianz mit einer Unsicherheitsquote von $\pm 15\%$ belastet. Vielmehr sollte es bei Beachtung der beschriebenen Effekte gelingen, die Gesamt-Varianz von Enzymaktivitäts-Befunden einzuengen, dadurch die Grenzen zwischen physiologischen und pathologischen Werten enger zu ziehen, die Aussagekraft zuverlässiger zu gestalten und damit schließlich die Empfindlichkeit der Enzymdiagnostik weiter zu steigern.

Würden z. B. die Daten aus der Tabelle 2 dazu dienen, die oberen Grenzwerte der Norm zu berechnen ($\bar{x} + 2 s_x$), käme man zu deutlich differierenden Zahlen abhängig davon, welche der Versuchsperioden man hierzu heranzöge.

Im Liegen: Lactatdehydrogenase 141 U/l, Malatdehydrogenase 88,6 U/l, Aspartataminotransferase 12,1 U/l, Alaninaminotrans-

ferase 11,1 U/l, γ -Glutamyltransferase 16,3 U/l und Creatinkinase 42,5 U/l.

Im Stehen: Lactatdehydrogenase 149 U/l, Malatdehydrogenase 114 U/l, Aspartataminotransferase 13,6 U/l, Alaninaminotransferase 12,6 U/l, γ -Glutamyltransferase 17,8 U/l und Creatinkinase 49,9 U/l.

Es ist sicher nicht praktikabel, Normal- oder Referenzwerte für stehende und liegende Patienten zu erarbeiten, man sollte jedoch, genau wie in der Analytik, eine strenge Standardisierung der Probengewinnung und der Vorbereitung des Patienten fordern, wenn man später zu absolut zuverlässigen und bei Verlaufsbeobachtungen auch vergleichbaren Ergebnissen kommen will. In vielen Fällen dürfte bei diagnostischen Überlegungen schon die Einbeziehung von Protein- oder Hämatokritwerten ausreichen, um bei Enzymaktivitätsänderungen sicher zwischen physiologischen und pathologischen Ursachen unterscheiden zu können.

Literatur

1. Bär, U. & Ohlendorf, S. (1970). *Klin. Wochenschr.* 48, 776–780.
2. Bär, U., Friedel, R., Heine, H., Mayer, D., Ohlendorf, S., Schmidt, F. W. & Trautschold, I. (1972/73). *Enzyme* 14, 133–156.
3. Boyd, J. W. (1967). *Biochim. Biophys. Acta* 132, 221–231.
4. Boyd, J. W. (1967). *Biochim. Biophys. Acta* 146, 590–593.
5. Posen, S. (1970). *Clin. Chem.* 16, 71–84.
6. Schmidt, E. & Schmidt, F. W. (1969), in *Biochemistry of Exercise*, (Poortmans, J. R. ed.), S. 216. Karger, Basel/New York.
7. Siest, G. & Galteau, M. M. (1974). *Enzyme* 17, 179–195.
8. Ledwich, J. R. (1973). *Can. Med. Ass. J.* 109, 273–278.
9. Planz, G. & Palm, D. (1973). *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 5, 255–258.
10. Statland, B. E., Winkel, P. & Bokelund, H. (1973). *Clin. Chem.* 19, 1374–1379.
11. Mattenheimer, H. (1970). *Micromethods for the Clinical and Biochemical Laboratory*, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor.
12. Hess, B. & Raftopoulos, R. (1957). *Deut. Arch. Klin. Med.* 204, 97–106.
13. *Wissenschaftliche Tabellen*, Documenta Geigy (1968). 7. Auflage, S. 550, Basel.
14. Böhme, A. (1911). *Deut. Arch. Klin. Med.* 103, 522–562.
15. Fawcett, J. K. & Wynn, V. (1960). *J. Clin. Pathol.* 13, 304–310.
16. Eisenberg, S. (1963). *J. Lab. Clin. Med.* 61, 755–760.
17. Renkin, E. M. (1968), in *Lymph and the Lymphatic System*. (Mayerson, H. S. ed.) S. 76, Thomas, Springfield.
18. White, J. C., Field, M. E. & Drinker, C. K. (1933). *Amer. J. Physiol.* 103, 34–44.
19. Nix, J. T., Mann, F. C., Bollmann, J. L., Grindlay, J. H. & Flock, E. V. (1951). *Amer. J. Physiol.* 164, 119–122.

Priv.-Goz. Dr. R. Friedel
Inst. f. Klin. Biochem.
u. Physiol. Chem. d. MHH
Karl-Wiechert-Allee 9
3000 Hannover 61

